

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-59850

(43) 公開日 平成10年(1998) 3月3日

(51) Int. Cl. ⁵	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/70	A E D		A 6 1 K 31/70	A E D
	A C D			A C D
48/00	A B E		48/00	A B E
C 1 2 N 15/09	Z N A		C 0 7 H 21/04	Z
// C 0 7 H 21/04		9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
			審査請求 未請求	請求項の数 7 F D (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平9-143539

(22) 出願日 平成9年(1997) 5月16日

(31) 優先権主張番号 特願平8-148090

(32) 優先日 平8(1996) 5月17日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000206956

大塚製薬株式会社

東京都千代田区神田司町2丁目9番地

(72) 発明者 大田 健

東京都文京区湯島4-8-3-205

(74) 代理人 弁理士 三枝 英二 (外10名)

(54) 【発明の名称】 血小板由来増殖因子発現抑制剤

(57) 【要約】

【課題】 P D G F の発現を抑制することができ、この発現に起因する各種の疾患、特に間質性肺炎等の肺の線維化を抑制、治療することができる P D G F 発現抑制剤を提供。

【解決手段】 血小板由来増殖因子 (P D G F) の B 鎖の任意の領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする P D G F 発現抑制剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】血小板由来増殖因子のB鎖の任意の領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項2】任意の領域がエクソン4の領域である請求項1記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項3】任意の領域がエクソン1の領域である請求項1記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項4】任意の領域がスプライシングサイトを含む領域である請求項1記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項5】任意の領域がエクソン2とエクソン3の間の領域、エクソン5の領域、エクソン4とエクソン5の間の領域、エクソン6の領域又はエクソン7の領域である請求項1記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項6】アンチセンスオリゴヌクレオチドが配列番号1~18で示されるものから選ばれたものである請求項1記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【請求項7】間質性肺炎治療剤である請求項1~6のいずれかに記載の血小板由来増殖因子発現抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、血小板由来増殖因子(Platelet derived growth factor, PDGF)の発現抑制剤、より詳しくは、間質性肺炎治療剤として有用なPDGF発現抑制剤に関する。

【0002】

【従来の技術】間質性肺炎における肺の線維化には、各種のサイトカインの関与が提起されている。すなわち、肺の線維化は傷害治療過程と理解され、これに関与する細胞群としては、間葉系細胞を構成する線維芽細胞、平滑筋細胞、血球細胞由来のマクロファージ、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、上皮細胞としての肺胞上皮細胞、気道上皮細胞、血管内皮細胞等が知られている。炎症刺激下等において、これらの細胞はそれぞれ活性化され、健康状態下とは異なる遺伝子の発現をきたし、種々のサイトカイン等を発現し、また接着分子の変化発現も惹起させる。

【0003】これらの各種細胞により産生発現されるサイトカインとしては、例えばインターロイキン類(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8等)、CSF類(GM-CSF、G-CSF、M-CSF等)、TNF類、TGF β 類、IFN類、成長因子(EGF、TGF β 、PDGF、IGF等)等が知られているが、これらのうち、肺の線維化病変に重要な役割を演じているのは、IL-6、IL-8、TGF β 等ではなく、PDGFであることが報告されている【例えば第34回日本胸部疾患、講演要旨集191頁、192頁(1994年度)、第35回日本胸部疾患、講演要旨集第232頁(1996年度)等参照】。

【0004】上記PDGFは、当初ヒト血小板に見出された。これはA鎖(分子量約16K)とB鎖(分子量約14K)からなる分子量約30Kの強塩基性糖蛋白質であり、両鎖にはシステイン残基が8個づつあり、両鎖のペプチド内及びペプチド間にS-S結合が存在し、熱に安定な構造をとっている。ヒト血小板顆粒内に含まれる主要なPDGFは、上記A鎖とB鎖とのヘテロ二量体(PDGF-AB)であり、これが約70%を占め、残りは大部分B鎖のホモ二量体(PDGF-BB)で、僅かにA鎖のホモ二量体(PDGF-AA)も認められる。

【0005】上記A鎖及びB鎖とも既にcDNAが発見、単離されており、B鎖はSSVのトランスホーミング遺伝子v-sisの遺伝子産物と高い相同性を有しており、該B鎖遺伝子は、v-sisのプロトオンコゲンであるc-sisそのものである。

【0006】一方、従来より、アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いて遺伝子発現を抑制する技術及びその医薬品への応用が提案、検討されている。

【0007】この遺伝子発現の抑制技術は、細胞内の標的核酸配列に特異的に結合する物質、すなわちアンチセンス物質を生体内に導入し、生体の遺伝情報の流れを遮断して、目的とする蛋白の構成を特異的に抑制する技術としてとらえられている。この遺伝子の発現抑制技術を利用すれば、標的とする内在性又は外來性遺伝子の発現を特異的に抑制することができ、該標的遺伝子の発現又は不適切な発現の結果生じる疾患等の治療ができると考えられている。しかもこの技術は、用いられるアンチセンスオリゴヌクレオチドが、特に生体内の書が極めて少ないと考えられる点からも注目を浴びている。

【0008】しかるに、標的細胞の発現を有意に抑制できるアンチセンスオリゴヌクレオチドの選択、すなわち、所望の効果を奏し得るアンチセンス配列の選択乃至決定は、これを事前に予測する確立された方法がなく、アンチセンスオリゴヌクレオチドの提供において、多大の解決すべき問題を残している。例えば、翻訳開始部位やその上流の非翻訳領域から選択する方法等、アンチセンス配列の決定におけるいくつかの試みが提案されているが、目的とする標的遺伝子により事情が相違し、結局は、試行錯誤による選択によっているのが現状である(特開平8-70899号公報等参照)。

【0009】なお、アンチセンスDNAによるPDGFの発現抑制によって、血管増殖の抑制から高血圧症の血管障害等への応用が報告、示唆されている(第18回日本炎症学会プログラム予稿集、平成7年、85頁)。この報告に係わるアンチセンスDNAは、PDGFのA鎖の特定16塩基長のアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)であり、正常血圧ラットでは所望の効果を奏させていない。

【0010】以上のように、アンチセンス技術は、種々

研究され、遺伝子治療分野及び医薬品開発分野で注目を集めつつあるもの、PDGFにおいて所望の発現抑制が達成されたことはなく、勿論、間質性肺炎等の肺の線維化病変に応用された例もない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、PDGFの発現抑制効果を奏する所望のアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に間質性肺炎治療におけるその利用を確立、提供する点にある。

【0012】かかる実情において、本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、PDGFのB鎖(c-sis)の任意の領域の配列から選択されたアンチセンス配列を有するアンチセンスオリゴヌクレオチドが、PDGFの発現抑制効果に寄与することを見出し、本発明を完成した。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明は、血小板由来増殖因子のB鎖の任意の領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分とする血小板由来増殖因子発現抑制剤に係るものである。

【0014】また、本発明は、血小板由来増殖因子のB鎖の任意の領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する間質性肺炎治療剤に係るものである。

【0015】以下、本明細書におけるアミノ酸、ペプチド、塩基配列、核酸等の略号による表示は、IUPAC、IUBの規定、「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(特許庁)及び当該分野における慣用語に従うものとする。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明において、アンチセンスオリゴヌクレオチドには、PDGF-B鎖のDNA配列から転写されたmRNAの配列(センス配列)に相補的な配列(アンチセンス配列)を有するオリゴヌクレオチドが含まれ、これはアンチセンスDNA又はアンチセンスRNAであることができる。本発明におけるかかるアンチセンス配列は、PDGF-B鎖の任意の領域に対するものであり、この任意の領域としては、アンチセンスオリゴヌクレオチドが結合しやすい領域、すなわち二次構造を取りにくい(一次構造を取りやすい)領域であればいずれでもよい。

【0017】従って、この領域の配列に効果的にハイブリダイゼーションすることができる限り(かくしてPDGFの遺伝子及び/又は蛋白質の発現が抑制される)、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、その配列の位置、長さ、修飾化、ミスマッチの存在等には何等限定されるものではない。

【0018】かかるPDGF-B鎖の塩基配列は、既に知られており(例えばヒトPDGF-B鎖については、Cell, Vol. 39, 1984, 89-97; Nature, Vol. 316, 22 August 1985, 748-750; Molecular and Cellular Biology, Vol. 10, 1990, 5496-5501等参照)、本発明の利用

の態様に従って、対象とする由来、起源(種)に対応する配列を利用するのが好ましい。

【0019】本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、上記PDGF-B鎖の任意の領域の配列を含む約15~30マー(mer)程度の連続したセンス配列に対するアンチセンスDNAとして示示することができる。

【0020】また、本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えばホスホジエステル結合のリン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子に代えたチオスホロチオエート型(S-オリゴ)、同リン酸基の酸素原子をメチル基に置換したメチルチオスホノエート型(M-オリゴ)、リン酸結合をα-結合に代えたα-オリゴ型、さらにアクリジンやポリリジンの結合による修飾等の種々の形態とすることができる(Biochemistry, 27, 9113-9121(1988); Anti-Cancer Drug Design, 3, 117-127(1988); Nucleic Acids Res., 19, 747-750(1991)等)。

【0021】有効成分とするアンチセンスオリゴヌクレオチドの代表的配列としては、例えばPDGF-B鎖のエクソン4の領域、すなわちコドン97~180番目のアミノ酸配列領域、特にコドン106から112番目のアミノ酸配列に対応するアンチセンス配列(K)を例示することができる。ヒトにおける該配列は、配列表に配列番号:1として示す通りであり、マウスにおける配列は、配列表に配列番号:2として示す通りである。

【0022】また、エクソン1の領域、特に開始コドンを含む領域に対するアンチセンス配列(D)、スプライシングサイトを含む領域、特にエクソン5とエクソン6の間の領域に対するアンチセンス配列(C)が挙げられる。ヒト及びマウスにおける配列Dは、配列番号:3に示す通りであり、マウスにおける配列Cは配列番号:4に、ヒトにおける配列Cは配列番号:5に示す通りである。

【0023】さらに、アンチセンス配列(D)以外のエクソン1の領域に対するアンチセンス配列(E、H)、エクソン2とエクソン3の間の領域に対するアンチセンス配列(A)、エクソン5の領域に対するアンチセンス配列(F)、エクソン4とエクソン5の間の領域に対するアンチセンス配列(B)、エクソン6の領域に対するアンチセンス配列(G)、エクソン7の領域に対するアンチセンス配列(I)なども挙げられる。マウス及びヒトにおける配列Eは配列番号:6に、マウスにおける配列Hは配列番号:7に、ヒトにおける配列Hは配列番号:8に、マウスにおける配列Aは配列番号:9に、ヒトにおける配列Aは配列番号:10に、マウスにおける配列Fは配列番号:11に、ヒトにおける配列Fは配列番号:12に、マウスにおける配列Bは配列番号:13に、ヒトにおける配列Bは配列番号:14に、マウスにおける配列Gは配列番号:15に、ヒトにおける配列Gは配列番号:16に、マウスにおける配列Iは配列番号:

号: 17に、ヒトにおける配列Iは配列番号: 18に、それぞれ示す通りである。

【0024】これらの配列のうち、配列K(エクソン4の領域)、配列D(エクソン1の領域)、配列C(スプライシングサイトを含む領域)が好ましい。

【0025】なお、これらの代表的配列のアンチセンスオリゴヌクレオチドの各々の塩基数とPDGF-B鎖遺伝子のどの部位に対する配列であるかの位置関係は図1に示す通りである。

【0026】本発明において有効成分とするアンチセンスオリゴヌクレオチドは、かかるアンチセンス配列からなるDNA及び/又はRNAであり、これ等は一般的な手法、例えば市販の自動合成機を用いたフォスフォアミダイトやハイドロジェンフォスフォネート等を用いる固相合成法等により容易に合成することができる。

【0027】また、上記各種の修飾化も常法に従って行なうことができ、これらの修飾のための市販試薬も好適に使用することができる。

【0028】かくして得られるオリゴヌクレオチドの精製も常法に従うことができ、例えば、通常の高濃度クロマトグラフィーやポリアクリルアミドゲル電気泳動、溶媒抽出、塩析等による方法を適宜採用することができる(J. Am. Chem. Soc., 106, 6077(1984); J. Org. Chem., 50, 390(1985)等)。すなわち、本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、任意のセンス配列に対して所望のハイブリダイスを形成できる限り、その合成法や由来等には何等の制限もない。

【0029】また、本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドの製造において採用され得る各種の操作、例えば一部遺伝子の化学合成、同切断、削除、付加乃至結合を目的とする酵素処理、単離、精製、複製、選択等は、いずれも常法に従うことができる【例えば、分子遺伝学実験法、共立出版(株)1983年発行; PCRテクノロジー、宝酒造(株)1990年発行等参照】。

【0030】このようにして得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドは、PDGF発現抑制作用に優れ、これを有効成分とするPDGF発現抑制剤、特に間質性肺炎治療剤として有用である。

【0031】なお、かくして得られるアンチセンスオリゴヌクレオチドのPDGF発現抑制作用は、例えばPDGFをコードする遺伝子が存在する転写翻訳系に当該アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して、PDGFの発現阻害を調べ、又はPDGFをコードする遺伝子に対応するmRNAが存在する系に当該アンチセンスオリゴヌクレオチドを添加して、PDGFの発現阻害を調べることにより確認できる。

【0032】上記有効成分は、これをそのまま医薬品として利用することもできるが、一般には、通常のこの種DNA試薬等の医薬品としての応用に従って、遺伝子導入用試薬や、適当な担体等を用いて各種の組成物にし

て実用することができる。

【0033】上記担体としては、有効成分に悪影響を与えないことを前提として、この種医薬品に通常採用されている薬学的に許容される各種の賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等から適宜選択して使用でき、形態も特に限定されず公知の各種の形態から適宜選択、決定できる。

【0034】本発明の有効成分は、これにより処置が必要な各種患者に対して、その形態に従い適宜適用される。その適用は処置を要する患部への直接適用とすることもでき、また血管内投与等の間接的適用とすることもできる。特に、間質性肺炎等の肺の線維化の処置に当たっては、例えば溶液形態である本発明有効成分を経気道的に直接適用する方法を好ましく例示することができる。

【0035】さらに、本発明の医薬は、所望により、持続性や膜透過性の向上を意図した封入剤、例えばポリフェクチンやリポソーム等、さらに各種の界面活性剤等を利用した形態として実用することもできる。

【0036】本発明における有効成分の投与量は、患者自体やその疾患状態等の条件に応じて適宜設定され、特に制限されるものではないが、例えば約1~10mg/患者を目安として上記条件に応じて適宜増減することができる。

【0037】かくして、本発明PDGF発現抑制剤は、これを標的宿主の生体に投与適用することによって、所望のPDGF発現抑制を図ることができる。PDGFの発現或いはその不適切な発現に起因する各種の疾患及び病態の治療を行なうことができる。殊に、本発明のPDGF発現抑制剤は、間質性肺炎の治療に好適であり、該間質性肺炎等における肺の線維化を抑制、治療することができる。

【0038】なお、本発明においては、上記有効成分としてのPDGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを直接生体に投与適用する代わりに、これを適当なプラスミドベクターに組み込んでアンチセンス組換え体を作成したり、アデノウイルスやレトロウイルス等の適当なウイルスベクターに組み込み、これを用いて標的宿主体内で所望のアンチセンスRNA、すなわち、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを発現させることもでき、かくして同様の治療効果を奏することができる。

【0039】

【実施例】以下、実施例及び試験例を挙げ、本発明をさらに詳しく説明する。

【0040】実施例1(アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製)

マウスPDGF-B鎖(c-sis)の106-112番目のアミノ酸配列に対応する配列番号: 2に示すオリゴヌクレオチドを、自動DNA合成装置(アプライズバイオシステムズ社製380A型)にて、TET試薬

(アブライドバイオシステムズ社製)により、ホスホジエステル結合のリン酸基の酸素原子の一つを硫黄原子に置換したフッソフォスホネート型(S-オリゴ)として合成した。

【0041】上記で合成したS-オリゴは、通常の方法に従って逆相高速液体クロマトグラフィーにて単離精製し、以下の試験に供した。

【0042】また、上記配列のセンスオリゴヌクレオチドを同様にして合成した。

【0043】試験例1

マウスに経気道的にシリカペースを投与すると肺に線維化が起こることから、この実験系により本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの効果を、次の通り試験した。

【0044】マウス(C57BL/6、5週齢)を以下の4群に群分けした。

【0045】1群:シリカのみ投与

2群:リポフェクチン(LIFE TECHNOLOGIES, Gaithersburg, MD, USA)のみ投与

3群:シリカ+リポフェクチン+アンチセンスオリゴヌクレオチド投与

4群:シリカ+リポフェクチン+センスオリゴヌクレオチド投与

まず、シリカの16mg/80μl生食溶液/1匹を、マイクロピペットを使用して、経鼻的に投与(1群、3群及び4群)して、肺の線維化を実験的に惹起させた。

【0046】上記シリカ投与の3時間後に、アンチセンスオリゴヌクレオチド(実施例1で調製したS-オリゴ型のもの)7μl(5mg/ml PBS)、PBS7μl及びリポフェクチン266μlからなる供試薬剤の40μl(3群)、及び同様にセンスオリゴヌクレオチド7μl、PBS7μl及びリポフェクチン266μlからなる対照薬剤の40μl(4群)を、それぞれ直視下に非侵襲的にマウスの気管支内に初回投与した。また、2群には、上記薬剤の代わりにリポフェクチン単独の40μlを同様にして投与した。

【0047】試験開始より1週間後に、2~4群には、それぞれ同様に供試薬剤、対照薬剤及びリポフェクチン単独を気管支内投与(2回目)した。

【0048】試験開始2週間後に、各群マウスの肺を摘出し、気管支肺胞洗浄(bronchial alveolar lavage: BAL)し、ハイドロキシプロリン、病理所見について検討した。

【0049】なお、BALは生理食塩水にて気管支内を洗浄し、5mlを回収し、その総細胞数、細胞画分を検討した。また、実験期間中、実験マウスには、SPF(無菌状態)で飼育し、自由摂食させた。

【0050】結果は次の通りであった。

【0051】(1)肺組織中のハイドロキシプロリン量:各群マウスの肺のハイドロキシプロリン量(μg)

を求めた棒グラフを図2に示す。

【0052】図2より、肺の線維化を客観的に評価するために測定されたハイドロキシプロリン量の比較では、シリカ単独投与群(1群)で81.9、5±12.4、6(平均±SD)μg/肺、リポフェクチン単独投与群(2群)で28.1、7±3.1、7μg/肺、シリカ+リポフェクチン+アンチセンスオリゴヌクレオチド投与群(3群)で49.8、2±4.1、3μg/肺、シリカ+リポフェクチン+センスオリゴヌクレオチド投与群(4群)で51.3、2±4.2、1μg/肺となり、1群に比べて、3群と4群とは有意に低下していた。また、2群の測定値は、シリカの投与を受けていない正常マウスの測定値と同等であった。

【0053】(2)BAL液中の細胞成分の解析:この細胞成分の解析によれば、1群に比べて3群で、総細胞数の有意な低下と、好中球の低下傾向を認めるに止まっている。

【0054】(3)病理所見:結果を図3(1群)、図4(3群)及び図5(4群)に示す。

【0055】これらの図より、1群で見られているシリカペース投与による著明な炎症細胞の浸潤は、3群ではほぼ消失し、4群では軽微化していた。

【0056】(4)考察:以上の結果より、マウスのシリカにより惹起される間質性肺炎・肺線維化モデルに対し、アンチセンスオリゴヌクレオチド+リポフェクチンと共に経気道的に投与することにより、肺の線維化の指標である肺組織中のハイドロキシプロリン量の有意な低下、及び病理所見での病変の消失が認められた。

【0057】この事実も、アンチセンスオリゴヌクレオチドが有効に作用して、PDGFの産生抑制を介して、シリカにより誘導される肺の炎症と線維化をほぼ完全に抑制したと考えられる。

【0058】すなわち、本実験の結果は、PDGFのアンチセンスオリゴヌクレオチドが、間質性肺炎、肺線維化の治療薬として有効であることを強く示唆するものである。

【0059】実施例2

配列番号2、3、4、6、7、9、11、13、15及び17に示すオリゴヌクレオチド(A~K)を、実施例1と同様にして合成した。

【0060】試験例2

構成的にPDGF-B mRNAを発現しているマウス monocyte-macrophage cell line であるJ774細胞を材料として用い、これを以下の方法により、実施例2で合成した種々のPDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチドで6、14、22時間処理し、J774細胞のPDGF-B mRNAレベルをスポットプロットハイブリダイゼーションで調べた。

【0061】(1)PDGFアンチセンスオリゴヌクレオチド+リポフェクチン試薬コンプレックスの調製

Solution A: 500 μ M PDGFアンチセンスオリゴヌクレオチドを、0.02% BSAを含むRPMI-1640 (抗生物質不含)で50倍希釈し、10 μ Mを20 μ l調製した(1well分)。

【0062】Solution B: リボフェクテン試薬(LIFE TECHNOLOGIES) 4 μ lを、0.02% BSAを含むRPMI-1640 (抗生物質不含)で5倍希釈し(1well分)、室温で45分放置した。

【0063】Solution AとSolution Bを穏やかに攪拌混合し、室温で15分インキュベートした。15分後、この混合溶液に0.02% BSAを含むRPMI-1640 (抗生物質不含)を160 μ l添加した(総容量: 200 μ l)。

【0064】J774細胞を 10^5 cells/0.18 ml/wellずつ96well platedにまき、37°C、5%CO₂インキュベーターで培養した。24時間後に、500 rpm、5分、20°Cで遠心し、培養上清を吸引除去した後、RPMI-1640 (抗生物質不含)を用い、200 μ l/wellで2回洗浄した。上述のPDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-リボフェクテン試薬コンプレックスをJ774細胞に200 μ l/wellずつ添加した。1種類のPDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-リボフェクテン試薬コンプレックスにつき24 wellずつ用いた。37°C、5%CO₂インキュベーターで6、14、22時間培養後、培養上清を捨てISOGEN (ニッポンジーン)を50 μ l/wellずつ添加し、プロトコールに従いRNA溶液を調製した(従って、1種類のPDGFアンチセンスオリゴヌクレオチドにつき、J774細胞は 2.4×10^4 cellsで、ISOGENは1.2 ml使用した)。RNA溶液の調製を以下に概略する。

【0065】ISOGEN処理した細胞に、クロロホルムを添加し激しく攪拌後、遠心分離(12,000rpm, 10min, 4°C)し、上層を新しいチューブに移しイソプロパノールを添加し、12,000rpm, 10min、4°Cで遠心分離して得た沈殿に、80%エタノールを添加しVortex後、7,500rpm, 6min、4°Cで遠心し上清を捨て沈殿を風乾し、蒸留水を加えRNA溶液を調製した。

【0066】(2) スロットブロットハイブリダイゼーション
RNA溶液 8 μ g/16 μ lに、ホルムアミド 32 μ l、ホルムアルデヒド 11.2 μ l、20 \times SSC (NaCl 175.32g、クエン酸ナトリウム 88.23gを蒸留水に溶解し1lとした後、オートクレーブ滅菌して調製) 3.2 μ lを添加し攪拌後、68°C、15分インキュベートした。15分後、3分間氷冷し、20 \times SSCを124.8 μ l加えた。

【0067】予め20 \times SSCに浸しておいたTRANSFER MEMBRANE (PALLBIOSUPPORT, DIV.)

を、500 μ l/slotの10 \times SSCで洗浄した後、PDGF-B用には、140 μ l/slotずつ、 β -Actin用には、40 μ l/slotずつ添加した。

【0068】それぞれ試料溶液を添加後、300 μ l/slotの10 \times SSCで2回洗浄した。BlotしたTRANSFER MEMBRANEは、UV照射後、ExpressHyb solution (CLONTECH Laboratories, Inc.)を用い、68°Cでプレハイブリダイゼーション後、³²PでラベルしたPDGF-B DNA probe又は β -Actin DNA probeでハイブリダイゼーションした。ハイブリダイゼーション終了後、TRANSFER MEMBRANEを2 \times SSC、0.1% SDSで40分間洗浄後、0.1 \times SSC、0.1% SDSで50°C、40分間洗浄した。洗浄したTRANSFER MEMBRANEは、GS-525 Sample Loading Dock中のExposure padに固定し、ScreenにExposeした後、GS-525 Molecular Imager Systemを用い、PDGF-B mRNAレベルを測定し、 β -Actin mRNAレベルに対し補正した。

【0069】(3) 結果: 図6に、スロットブロットハイブリダイゼーションの結果を示した。縦軸は、PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド及びリボフェクテンの代わりに蒸留水を添加したJ774細胞におけるPDGF-B/ β -Actinの比を100%とした時の各PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチドで処理したJ774細胞におけるPDGF-B/ β -Actinの比率の%を示している。この図より14時間インキュベートした時に、強い抑制を示すPDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチドが多いことが分かった。

【0070】6、14、22時間処理の結果を総合的に比較すると、PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-CとDが、KよりもPDGF-B mRNAレベルの強い抑制を示すことが分かった。また、PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-C、Dと同時に、ミスマッチ-C、D及びセンサ-C、Dを用いたスロットブロットハイブリダイゼーションの結果から、PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-C、Dの作用は、オリゴヌクレオチドの毒性によるものではないと判断した。従って、PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド-CとDを選択し、in vivoにおける効果について検討中である。PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド、ミスマッチ及びセンサ-CとDの配列は、図7に示した。

【0071】

【配列表】

【0072】配列番号: 1

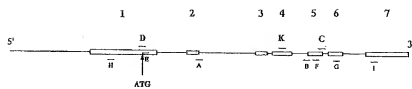
配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

11	(7)	特開平10-59850
鎖の数：一本鎖	※ 配列の種類：DNA	12
トポロジー：直線状	※	
配列： GTCTATGAGG CGCCGGAGA T		21
【0073】配列番号：2	※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：21	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	※ 配列の種類：DNA	
配列： ATCGATGAGG TTCCCGGAGA T		21
【0074】配列番号：3	10★鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	★ 配列の種類：DNA	
配列： AGCAGCGATT CATCCGACT CC		22
【0075】配列番号：4	☆鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：25	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	☆ 配列の種類：DNA	
配列： TGGGAGGCGA GCTTACCTCG CTGCT		25
【0076】配列番号：5	20◆鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：25	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	◆ 配列の種類：DNA	
配列： CTAGAAAGGT GGTACCTCG CTGCT		25
【0077】配列番号：6	※ 鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	※ 配列の種類：DNA	
配列： AGAGCGCCCA GCAGCGATTG AT		22
【0078】配列番号：7	30※鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	※ 配列の種類：DNA	
配列： TCGGCTCAGT CTGCTATCT AC		22
【0079】配列番号：8	★鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	★ 配列の種類：DNA	
配列： GCGAGTCCGT CGGTCCGTCT GC		22
【0080】配列番号：9	40☆鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	☆ 配列の種類：DNA	
配列： GCTCCGATT ACCTACGGAG TC		22
【0081】配列番号：10	◆鎖の数：一本鎖	
配列の長さ：22	トポロジー：直線状	
配列の型：核酸	◆ 配列の種類：DNA	
配列： GATTCCATTT ACCTCCGGG TC		22
【0082】配列番号：11	50 配列の長さ：25	

		(8)	特開平10-59850
	13		14
配列の型: 核酸		* トポロジー: 直線状	
鎖の数: 一本鎖		* 配列の種類: DNA	
配列:			25
GAGGTGGTCC TCCAGGTCA CTGTG			
【0083】配列番号: 12		※ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 25		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		※ 配列の種類: DNA	
配列:			25
CAGGTGGTCT TCCAGGTCA CCGTG			
【0084】配列番号: 13		10★ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		★ 配列の種類: DNA	
配列:			22
ATCTTTCTCA CCTGGAGGAC AA			
【0085】配列番号: 14		☆ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		☆ 配列の種類: DNA	
配列:			22
ATCTTTCTCA CCTGGAGGAC AG			
【0086】配列番号: 15		20◆ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		◆ 配列の種類: DNA	
配列:			22
CGCCTTGTC A TGGGTGTCT TA			
【0087】配列番号: 16		* 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		* 配列の種類: DNA	
配列:			22
CGTCTTGTC TGGGTGTCT TG			
【0088】配列番号: 17		30※ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		※ 配列の種類: DNA	
配列:			22
CAACATTATC ACTCCAAGGA CC			
【0089】配列番号: 18		★ 鎖の数: 一本鎖	
配列の長さ: 22		トポロジー: 直線状	
配列の型: 核酸		★ 配列の種類: DNA	
配列:			22
CAATATTATC TACTCCAAGG CC			
【図面の簡単な説明】			
【図1】本発明で用いるアンチセンスオリゴヌクレオチドの代表的配列がPDGF-B鎖遺伝子のどの部位に対する配列であるかの位置関係を示す図である。図中の番号を付した部位はエクソンを示す。	40	【図4】試験例1において、3群の肺組織の病理的所見を観察した生物の生態を示す写真である。	
【図2】試験例1に従って求められた各群マウスの肺組織中のハイドロキシプロリン量を示すグラフである。		【図5】試験例1において、4群の肺組織の病理的所見を観察した生物の生態を示す写真である。	
【図3】試験例1において、1群の肺組織の病理的所見を観察した生物の生態を示す写真である。		【図6】試験例2におけるスロットブロットハイブリダイゼーションの結果を示すグラフである。	
		【図7】PDGF-Bアンチセンスオリゴヌクレオチド、ミスマッチ及びセンスC並びにDの配列を示す図である。	

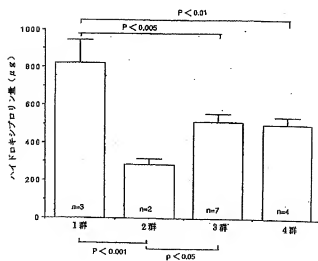
【図1】



アンチセンスオリゴヌクレオチド 塩基数

A	22
B	22
C	25
D	22
E	22
F	25
G	22
H	22
I	22
K	21

【図2】

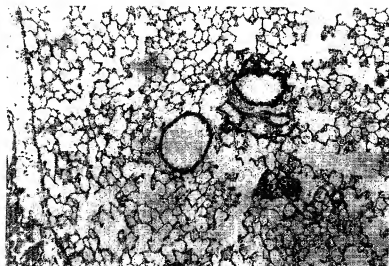


【図3】



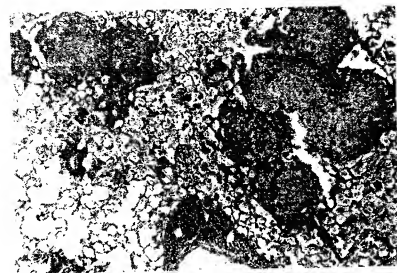
図面代用写真

【図4】



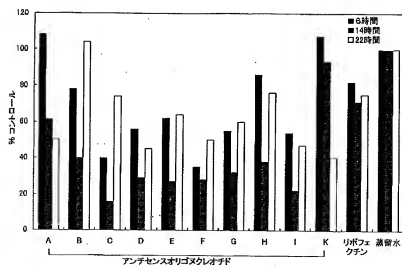
図面代用写真

【図5】



図面代用写真

【図6】



【図7】

【マウスPDGF-B鎖のスプライシングサイト】

⁵⁴⁴²
 C-センマ : 5'-AGCAGC GAG GTA AGC TGC CTT CCC A-3' (25-mer)
⁵⁴⁶⁶
 C-アンチセンマ: 5'-TGG GAA GGC AGC TTA CCT CGC TGC T-3' (25-mer)
 C-ミスマッチ : 5'-TGG GAT GGC AGA TGA CTT CGC CGC T-3' (25-mer, 6bp)

【マウスPDGF-B鎖のコード領域】

³⁰³⁷
 D-センマ : 5'-GGA GTC GGC ATG AAT CGC TGCT-3' (22-mer)
³⁰⁵⁸
 D-アンチセンマ: 5'-AGC AGC GAT TCA TGC CGA CTC C-3' (22-mer)
 D-ミスマッチ : 5'-CGCATC GAT TCA AGC TGA CGC C-3' (22-mer, 5bp)